PROGENIE MOLECULAR

CE

RealCycler®

Progenie molecular
Artes y Oficios 37. Valencia 46021. España. Tel. 902 91 05 05 Fax 902 91 05 06
www.progenie-molecular.com

HMPV-G v.1

1 Uso previsto

RealCycler HMPV-G es un kit de reactivos que permite la detección cualitativa por PCR a tiempo real del ARN de Metapneumovirus humano (hMPV) en muestras clínicas. El sistema incluye un control interno de amplificación para prevenir los falsos negativos debidos a la inhibición de la reacción.

2 Especificaciones

- Sensibilidad: 100 copias/µL.
- Especificidad: Metapneumovirus humano (gen nucleoproteína (N)).

3 Estabilidad y almacenamiento

Todos los componentes del kit *RealCycler* HMPV-G deben ser almacenados a -20ºC.
El kit es estable a - 20ºC hasta la fecha de caducidad (ver etiqueta externa del kit).

4 Descripción del método

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en la amplificación de una región específica del genoma del patógeno usando primers y sondas específicos. En la PCR a tiempo real se utilizan sondas marcadas con fluorocromos. Hay una emisión de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de ARN presente en la muestra. El *Cycle threshold* (Ct) es el ciclo de la PCR en el que se detecta inicialmente un aumento en la señal de fluorescencia. La amplificación de hMPV se detecta en TxR y la del control interno en Alx532.

5 Composición

RealCycler HMPV-G incluye la mezcla de reacción **Amplimix**, una **retrotranscriptasa** y un **Control Positivo ARN hMPV**. Todos los reactivos están listos para su uso sin añadir ni reconstituir ningún componente.

Componente	Viales	Núm.	Volumen	Conserv.
AmpliMix		1	850 µL	-15 /-25 ºC
Retrotrans-criptasa		1	13,5 µL	-15 /-25 ºC
Control Positivo ARN hMPV		2	60 µL	-15 /-25ºC

6 Material y equipamiento adicional requerido y no suministrado

- Equipo de PCR a tiempo real
- Kit de extracción de ARN
- Guantes desechables
- Pipetas calibradas
- Puntas de pipeta con filtro
- Congelador (-20ºC)

7 Advertencias y precauciones

- Todos los componentes del kit deben mantenerse en frío mientras se están manipulando.
- Después de añadir el ARN, minimizar el tiempo necesario para iniciar el programa de amplificación.
- Los tubos con la mezcla de amplificación no deben exponerse a la luz durante un periodo de tiempo prolongado.
- Descongelar y congelar repetidas veces los reactivos puede disminuir la sensibilidad del kit.
- Usar guantes desechables.
- Usar pipetas calibradas y puntas de pipeta con filtro.
- Los ensayos deben llevarse a cabo por personal cualificado y siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.
- No usar el kit después de la fecha de caducidad.
- Uso para diagnóstico *in vitro*.

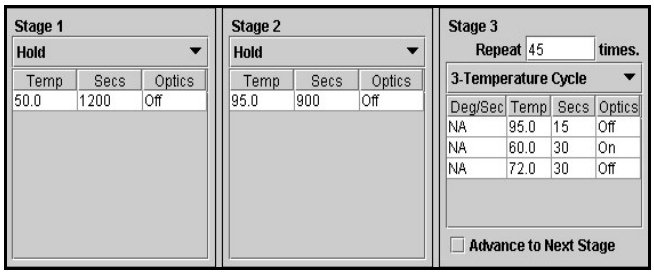
8 Muestras clínicas

- Recoger las muestras en tubos estériles.
- Almacenarlas y transportarlas congeladas a -20ºC hasta su uso.
- Utilizar ARN bien purificado y libre de inhibidores de la PCR.

9 Procedimiento

a) Extracción de ARN

b) Protocolo



Selección de fluoróforos:
- TxR: detecta hMPV.
- Alx532: detecta el control interno.

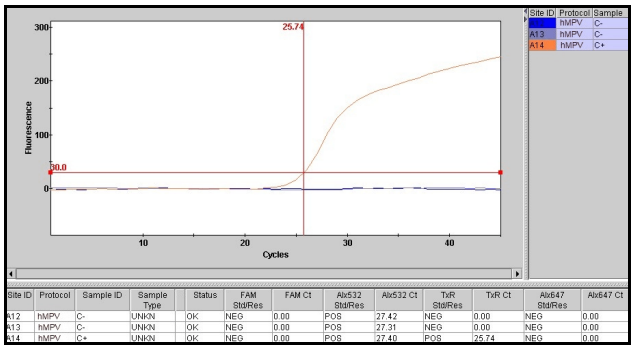
c) Preparación de la reacción

- Descongelar la **AmpliMix** y el **Control Positivo hMPV**.
- Tomar una alícuota de **17,5 µL** de Amplimix, añadir **0,25 µL** de **retrotranscriptasa** y **7,25 µL** del ARN de cada muestra o control a cada tubo.
- Colocar los tubos en el equipo.
- Seleccionar el protocolo "HMPV-G".
- Iniciar el programa de amplificación.

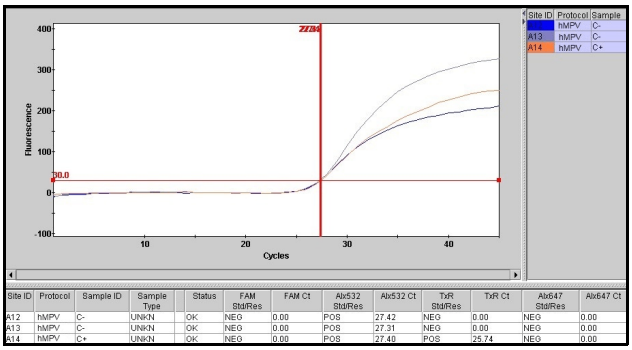
d) Interpretación de los resultados

TxR Std/Res	Alx532 Std/Res	Interpretación
POS	Indiferente	POSITIVO hMPV
ND	POS	NO SE DETECTA
ND	ND	NO VALORABLE

e) Ejemplo de resultado


25.74
30.0
Fluorescence
Cycles
Site ID Protocol Sample
A13 hMPV C-
A14 hMPV C+
Site ID | Protocol | Sample ID | Sample Type | Status | FAM Std/Res | FAM Ct | Alx532 Std/Res | Alx532 Ct | TxR Std/Res | TxR Ct | Alx647 Std/Res | Alx647 Ct
A12 | hMPV | C- | UNKN | OK | NEG | 0.00 | POS | 27.42 | NEG | 0.00 | NEG | 0.00
A13 | hMPV | C- | UNKN | OK | NEG | 0.00 | POS | 27.31 | NEG | 0.00 | NEG | 0.00
A14 | hMPV | C+ | UNKN | OK | NEG | 0.00 | POS | 27.40 | POS | 25.74 | NEG | 0.00

Gráfica 1 (Canal TxR: hMPV): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos y un control positivo hMPV. Control negativo (A12 en azul): ausencia de señal. Control negativo (A13 en gris): ausencia de señal. Control positivo hMPV (A14 en naranja): se observa señal con Ct=25,74.


27.84
30.0
Fluorescence
Cycles
Site ID Protocol Sample
A13 hMPV C-
A14 hMPV C+
Site ID | Protocol | Sample ID | Sample Type | Status | FAM Std/Res | FAM Ct | Alx532 Std/Res | Alx532 Ct | TxR Std/Res | TxR Ct | Alx647 Std/Res | Alx647 Ct
A12 | hMPV | C- | UNKN | OK | NEG | 0.00 | POS | 27.42 | NEG | 0.00 | NEG | 0.00
A13 | hMPV | C- | UNKN | OK | NEG | 0.00 | POS | 27.31 | NEG | 0.00 | NEG | 0.00
A14 | hMPV | C+ | UNKN | OK | NEG | 0.00 | POS | 27.40 | POS | 25.74 | NEG | 0.00

Gráfica 2 (Canal Alx532: control interno): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos y un control positivo hMPV. Control negativo (A12 en azul): se observa señal con Ct=27,42. Control negativo (A13 en gris): se observa señal con Ct=27,31. Control positivo hMPV (A14 en naranja): se observa señal con Ct=27,40.

10 Control de calidad

Se recomienda que se lleven a cabo controles positivos y negativos cada vez que se realice un análisis.
Cada lote del kit *RealCycler* HMPV-G ha sido testado según las especificaciones de la PCR a tiempo real utilizando el equipo *SmartCycler®* (*Cepheid®*).

11 Observaciones

Tabla de compatibilidad de fluoróforos.

Fluoróforo	Fluoróforo alternativo
FAM	
TET	CAL Fluor Gold 540
HEX	JOE, VIC, CAL Fluor Orange 560, Alexa 532
Texas Red	ROX, LC Red 610, CAL Fluor Red 610

Fecha de publicación: Marzo 2012.